

На правах рукописи

**Деревянчук
Екатерина Григорьевна**

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ,
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
И БИОХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ
НАРУШЕНИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗА ЧЕЛОВЕКА**

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2011

Работа выполнена в
ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет»
и Научно-исследовательском институте биологии ЮФУ.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шкурат Татьяна Павловна.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Губарева Любовь Ивановна;

доктор медицинских наук, профессор
Тактаров Владимир Германович.

Ведущая организация: Биологический факультет Московского
государственного университета
им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится _____ 2012 г. в
_____ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.256.09 при
Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставро-
поль, ул. Пушкина, д. 1, корп. 2, комн. 506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского госу-
дарственного университета.

Автореферат разослан _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Ржепаковский И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Среди важнейших задач эмбриологии человека одной из первых является изучение механизмов регуляции эмбриогенеза человека, а также поиск причин и диагностических маркеров его нарушений. Высокая частота патологии развития и внутриутробной гибели плода, на сегодняшний день не имеющая тенденции к снижению, обуславливает актуальность и значимость рассматриваемой проблемы. Статистико-популяционные исследования, посвященные поиску этиологических и диагностических биохимических и молекулярно-генетических факторов осложнений эмбриогенеза человека, ведутся с середины прошлого века. Тем не менее, процент нарушений эмбрионального развития человека невыясненной этиологии пока остается достаточно высоким (Бочков Н.П., 2006).

На настоящий момент по результатам многочисленных работ накоплен большой массив клинических данных, которые позволяют выделить аномальное содержание гомоцистеина, а также ассоциированные с ним недостаток фолиевой кислоты и полиморфизмы генов фолатного цикла, в отдельную группу причин, вызывающих различные нарушения репродуктивного здоровья человека (Brustolin S., 2010, Мирошниченко И.И., 2009, Бицадзе В.О., 2008). Не так давно было отмечено существование этнических, межпопуляционных, а также межрегиональных различий содержания гомоцистеина и фолиевой кислоты (Refsum H., 2004). Таким образом, для повышения качества и чувствительности диагностических мероприятий по выявлению нарушений эмбриогенеза необходимо изучение диапазонов содержания биохимических показателей, а также частот встречаемости мутантных аллелей генов фолатного метаболизма у жителей каждого отдельного региона страны.

Наряду с биохимическими и молекулярно-генетическими факторами растущий интерес представляют aberrантные эпигенетические процессы, приводящие к патологическому эмбриональному развитию человека (Yu L. et al., 2009, Diplas A.I. et al., 2009, Novakovic B. et al., 2008). Известно, что в реализации эпигенетической программы, а именно в процессе метилирования ДНК, опосредованное участие принимает гомоцистеин в качестве донора метильных групп (La Merrill M. et al., 2011, Van der Put N.M. et al., 2001). Поэтому особого внимания заслуживает сопряженное исследование нарушенных эпигенетических механизмов регуляции эмбриогенеза человека и несоответствующих норме молекулярно-генетических и биохимических показателей фолатного обмена в патогенезе эмбрионального развития человека как одной из перспективных и актуальных задач эмбриологии человека.

Цель работы: исследование эпигенетических, молекулярно-генетических и биохимических критериев нарушений эмбриогенеза человека.

Задачи исследования.

1. Установить диапазоны содержания гомоцистеина и фолиевой кислоты в сыворотке крови небеременных и беременных женщин Ростовской области при физиологическом течении гестационного процесса.

2. Оценить роль гомоцистеина и фолиевой кислоты в развитии широкого спектра нарушений раннего онтогенеза человека (спонтанный аборт, неразвивающаяся беременность, истмико-цервикальная недостаточность, гестоз).

3. Провести сравнительный анализ распределения отдельного и сочетанного носительства аллельных вариантов и генотипов генов фолатного обмена (*MTHFR*, *MTRR*, *MTR*) у беременных женщин ростовской популяции и изучить вклад полиморфных состояний генов фолатного обмена в развитие различного рода нарушений эмбриогенеза человека (спонтанный аборт, неразвивающаяся беременность).

4. Выяснить паттерн метилирования генов *ERVWE1*, *ERVFRDE1*, *AREG*, *BTC*, *DKK1*, *HAND1* и *MLH1* в плацентарных тканях в выборке женщин с физиологическим течением гестационного процесса и при наличии нарушений эмбрионального развития человека (спонтанный аборт, неразвивающаяся беременность).

5. Измерить глобальный уровень метилирования геномной ДНК в плацентарных тканях путем исследования статуса метилирования *LINE1* элементов и *HERVK*.

Научная новизна работы. Впервые установлены диапазоны содержания гомоцистеина и фолиевой кислоты в сыворотке крови небеременных и беременных женщин Ростовской области по триместрам. Впервые определена частота встречаемости аллелей *677T*, *2756G* и *66G* генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* соответственно у представительниц ростовской популяции и их прогностическая и клинико-диагностическая значимость в развитии широкого спектра нарушений эмбриогенеза человека. Впервые проведена комплексная оценка содержания гомоцистеина и фолиевой кислоты в сыворотке крови беременных женщин Ростовской области, наличия полиморфизмов генов фолатного обмена и уровня глобального метилирования ДНК.

Впервые установлены уровни метилирования промоторных и отдельных внутригенных регионов генов *AREG*, *BTC*, *DKK1*, *HAND1*, *MLH1*, *ERVWE1*, *ERVFRDE1*, *HERVK* и *LINE1* в плацентарных тканях на ранних этапах эмбрионального развития. Впервые обнаружено тканеспецифическое метилирование внутригенных регионов, т.е. интронов и экзонов, генов *AREG* и *BTC* в децидуальной и хорионической тканях плаценты. Впервые подтверждена роль экзона 2 в качестве альтернативного промотора гена *AREG* и показана его активность в плодной части плаценты, регулируемая с помощью метилирования. Впервые путем исследования статуса метилирования *LINE1* элементов и *HERVK* показано, что глобальный уровень метилирования геномной ДНК в хорионической ткани ниже, чем децидуальной.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Установленные диапазоны содержания гомоцистеина и фолиевой кислоты для женщин Ростовской области повысили качество диагностики и прогнозирования репродуктивных потерь, ассоциированных с несоответствующими норме биохимическими критериями фолатного обмена.

2. Среди широкого спектра нарушений эмбриогенеза человека повышенный уровень гомоцистеина является достоверным фактором риска и диагностиче-

ским маркером гестоза, так как было установлено, что в III триместре беременности повышенный уровень гомоцистеина в сыворотке крови женщин ростовской популяции увеличивает риск развития гестоза в 13,5 раз.

4. Сравнительный анализ вычисленных частот распространения аллелей *677T MTHFR*, *2756G MTR* и *66G MTRR* у женщин с физиологически протекающей беременностью и эмбриональной потерей плода позволил установить группы риска по развитию осложнений репродуктивного здоровья и повысил точность прогнозирования нарушений эмбриогенеза человека, сопряженных с носительством полиморфизмов генов фолатного обмена.

5. Риск потери беременности ассоциирован с носительством полиморфизмов генов *C677T MTHFR* и *A66G MTRR*; неразвивающаяся беременность – с носительством патологического аллеля *2756G* гена *MTR* в гомозиготном состоянии.

6. Установленные уровни тканеспецифического метилирования регионов экзона 2 гена *AREG*, интронов 2 и 4 гена *BTC*, 5`*LTR* генов *ERVWE1* и *ERVFRDE1*, *LTR HERVK* и 5`*UTR LINE1* являются потенциальными маркерами в оценке процессов формирования и функционирования плаценты, и могут быть использованы для установления эпигенетических причин возникновения различных нарушения эмбриогенеза.

Теоретическое и практическое значение работы. Научно-теоретическая значимость исследования заключается в раскрытии новых причин, а также в уточнении параметров уже установленных факторов риска, прямо или косвенно обуславливающих нарушения эмбрионального развития человека. Результаты настоящей работы расширяют имеющиеся знания об эпигенетических механизмах регуляции раннего онтогенеза человека и выяснения паттерна метилирования специфических генов плаценты при физиологически протекающей беременности. Имея теоретическое представление об эпигенетической модели регуляции экспрессии генов в норме, на практике легко обнаружить несоответствие установленному паттерну метилирования и диагностировать наличие нарушения эмбриогенеза человека.

В практическом смысле полученные диапазоны содержания гомоцистеина и фолиевой кислоты в сыворотке крови беременных женщин Ростовской области позволили оптимизировать и повысить качество прогностических и диагностических мероприятий по выявлению осложнений течения беременности и конкретных форм патологии эмбриогенеза человека, ассоциированных с отклонениями от нормы показателей фолатного метаболизма. Полученные сведения о частотах неблагоприятных аллелей генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* в ростовской популяции предоставили возможность с более высокой точностью устанавливать риск развития нарушений эмбриогенеза человека, опосредованных наличием полиморфизмов генов фолатного обмена. Данные эпигенетических исследований могут быть использованы в ходе дальнейшего изучения наследования эпигенетического паттерна, а также имеют практический смысл для раскрытия эпигенетических механизмов возникновения различных нарушения эмбриогенеза.

Полученные в работе новые экспериментальные данные внедрены в лабораторную и практическую деятельность КДЛ «Наука» и «Центра репродукции

человека и ЭКО», а также используются при чтении лекций в общем курсе «Биология развития и размножения» и специальных курсах «Предиктивная медицина», «Медицинская генетика» и «Гератология».

Работа выполнена в рамках тематического плана научно-исследовательских работ НИИ биологии ЮФУ «Исследование прогностических геномных и постгеномных маркеров эмбрионального развития человека», в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009 – 2013» по теме «Разработка технологии мониторинга репродуктивной функции человека и развития плода с использованием новых геномных и постгеномных маркеров», государственный контракт № 02.740.11.0501, а также ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2010 – 2013» по теме «Создание биоинформационной технологии поиска взаимосвязанных сценариев организации в геномах животных и человека некодирующей ДНК и кодирующей белок ДНК», государственный контракт № 14.740.11.0006, на базе ФЦП МОН РФ Центра коллективного пользования научным оборудованием Южного федерального университета «Высокие технологии», государственный контракт № 16.552.11.7024 и ЦКП ЮФУ «Биотехнология, биомедицина и экологический мониторинг».

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на научных сессиях биолого-почвенного факультета ЮФУ (Ростов-на-Дону, 2008-2010 гг.); на II международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2008); на заседании кафедры генетики Университета земель Саар (Саарбрюкен, Германия, 2010); на заседании Ростовского отделения общества ВОГиС (Ростов-на-Дону, 2011); на IV международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2011).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 17 работ, в том числе 4 из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание искомой ученой степени.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 42 отечественных и 246 зарубежных источника, приложения. Работа содержит 22 таблицы, иллюстрирована 19 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования

Объектом настоящего исследования явились группы небеременных и беременных женщин с различным характером течения и исходом беременности (гестоз (Г), истмико-цервикальная недостаточность (ИЦН), неразвивающаяся беременность (НБ), спонтанный аборт (СА), физиологически протекавшая беременность (ФБ)). Все исследования проводились с информированного пись-

менного согласия беременных женщин, находившихся на учете в родовспомогательных учреждениях г. Ростова-на-Дону, а также с соблюдением биоэтических норм и требований. Материалом для исследования концентраций гомоцистеина и фолиевой кислоты послужила сыворотка крови беременных и небеременных женщин Ростовской области (табл. 1).

Таблица 1 – Количество исследованных человек в зависимости от диагноза, срока гестации и измеренного показателя

Тип группы	Диагноз	Триместр беременности	Измеренный показатель	
			Гомоцистеин (количество человек)	Фолиевая кислота (количество человек)
I группа	СА	I	8	7
II группа	НБ	I	7	6
III группа	ИЦН	II	8	7
IV группа	Г	III	12	11
Контрольная группа I	ФБ	I	27	25
Контрольная группа II	ФБ	II	27	13
Контрольная группа III	ФБ	III	56	51
Контрольная группа IV*	-	-	23	8

Примечание: * – группа небеременных женщин.

Из исследования были исключены женщины, имевшие в анамнезе заболевания, влияющие на концентрацию биохимических показателей фолатного обмена. В исследование были включены женщины, родившиеся в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области. Для молекулярно-генетического исследования полиморфизмов генов фолатного цикла *C677T MTHFR*, *A2756G MTR* и *A66G MTRR* образцы цельной крови были отобраны в I триместре гестации у 7 беременных женщин из I группы, 10 – из II группы, 30 – из контрольной группы I. Репрезентативную контрольную группу V составили 196 практически здоровых небеременных женщин, родившихся и проживающих в Ростовской области. Образцы децидуальной и хорионической тканей для эпигенетических исследований были получены после выскабливания полости матки, проведенного в связи с самопроизвольным абортom (I группа, 5 человек) и неразвивающейся беременностью (II группа, 5 человека), а также после хирургического прерывания беременности у женщин с физиологическим течением гестации (контрольная группа I, 6 человек).

Уровень гомоцистеина в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного метода тест-системой «Axis Homocysteine EIA» («Axis-Shield», Норвегия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «ALISEI Q.S.». Определение уровня фолиевой кислоты в сыворотке крови осуществляли с использованием микропланшета, покрытого *Lactobacillus rhamnosus*, производства ID-Vit Folsäure / Folie Acid (Germany). Выделение геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови осуществлялось с помощью термокоагуляционно-

го метода с использованием реагентов «ДНК-Экспресс» (Литех, Москва). Полиморфизмы генов *C677T MTHFR*, *A66G MTRR* и *A2756G MTR* исследовали с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Москва). Выделение геномной ДНК из плацентарных тканей осуществлялось согласно стандартному протоколу фенол-хлороформного метода. Для исследования уровней метилирования генов, геномная ДНК была обработана бисульфитом натрия. Количественный анализ метилирования ДНК в специфических сайтах определяли SIRPH-методом. Для того чтобы проанализировать ткани на наличие контаминации во всех парах образцов нами были генотипированы 4 однонуклеотидных полиморфизма с высокой гетерозиготностью. Генотипирование проводили путем SNUPE метода с последующей денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографией (dHPLC) для подсчета количества аллелей. Регионы экзон 2 гена *AREG*, интроны 2 и 4 гена *BTC*, 5'LTR генов *ERVFRDE1* и *ERVWE1*, LTR *HERVK* и 5'UTR *LINE1* были проанализированы методом глубокого бисульфитного секвенирования (ultradeep bisulfite sequencing). Для оценки уровня экспрессии гена *AREG* в плацентарных тканях нами была проведена ОТ-ПЦР. Выделение тотальной РНК из образцов плацентарных тканей проводилось экстракцией смесью гуанидинтиоционат-фенол-хлороформ (Chomczynski P. et al., 1987). Синтез кДНК, комплементарной тотальной РНК, осуществляли с использованием набора реагентов для ОТ (Синтол, Москва).

Статистический анализ результатов биохимических исследований проводили с помощью лицензионного пакета StatPlus Professional версия 2009, а также GraphPad InStat версия 3.06 для Windows. Статистически значимыми считались различия при $P < 0,05$ и $p < 0,05$. Статистическую значимость различий между группами в распределении частот аллелей и генотипов изучаемых генов оценивали посредством критерия χ^2 . Когда объем выборки с отдельным генотипом не превышал 5, применяли критерий Фишера. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Различия в уровнях метилирования между хорионической и децидуальной тканями, полученными от одной женщины, были рассчитаны с помощью парного t-теста. Статистически значимыми считались различия при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования биохимических и молекулярно-генетических показателей фолатного обмена при различном течении эмбриогенеза человека

В результате проведенного нами исследования концентрация гомоцистеина в сыворотке крови небеременных женщин Ростовской области колебалась в пределах от 5,44 до 11,35 мкмоль/л. Диапазоны уровней гомоцистеина в сыворотке крови беременных женщин в зависимости от триместра физиологически протекающей беременности составили в 2,08 – 14,35, 1,33 – 10,66 и 4,53 – 12,72 мкмоль/л в I, II и III триместрах гестации соответственно. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови во II триместре физиологически протекающей беременности было достоверно ниже по сравнению с его содержанием у небеременных женщин ($5,99 \pm 0,45$ и $8,40 \pm 0,31$ мкмоль/л соответственно, при $p < 0,01$).

Также нами была обнаружена статистически значимая обратная зависимость уровня гомоцистеина от недели гестации в I триместре беременности ($R=-0,65$; 95% ДИ: $(-0,86) - (-0,25)$, при $p<0,01$). Таким образом, по мере увеличения срока гестации ко второму триместру физиологически протекающей беременности происходит снижение уровня гомоцистеина в среднем на 28,65%. Наблюдаемое снижение содержания гомоцистеина при физиологически протекающей беременности может быть связано с увеличением потребности растущего плода в метионине (Steegers-Theunissen R.P. et al., 1997), увеличением почечного клиренса гомоцистеина и снижением количества альбуминов плазмы (Walker M.C. et al., 1999). При сравнении средних значений уровней гомоцистеина в контрольных группах I, II и III были обнаружены статистически значимые различия между содержанием гомоцистеина в сыворотке крови в I и II триместрах беременности ($p<0,05$), а также высоко значимые отличия – во II и III триместрах беременности ($p<0,001$) (рис. 1).

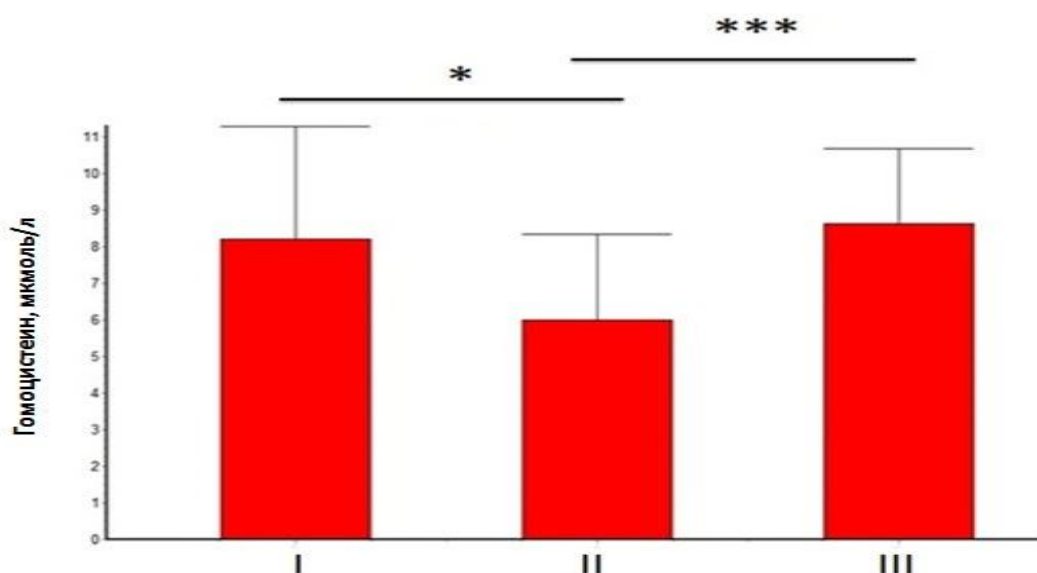


Рис. 1. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови женщин Ростовской области при физиологически протекающей беременности; I, II и III – контрольные группы I, II и III, соответственно; * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

В ходе нашего исследования были установлено, что в среднем уровень фолиевой кислоты у небеременных женщин Ростовской области составляет 14,50 мкг/л. В зависимости от триместра физиологически протекающей беременности были установлены следующие границы содержания фолиевой кислоты в сыворотке крови женщин: I триместр – 2,42 – 15,56 мкг/л; II триместр – 9,33 – 17,33 мкг/л; III триместр – 2,67 – 20,09 мкг/л. Уровень фолата в сыворотке крови беременных женщин ниже, чем у небеременных, причем его максимальное снижение наблюдается в I триместре беременности ($8,99\pm 1,31$ мкг/л). При изучении уровня гомоцистеина при патологическом течении I триместра гестации, нами было обнаружено, что его концентрация ниже на 0,5 и 1,1 мкмоль/л в I и II исследуемых группах соответственно по сравнению с контрольной группой I ($p>0,05$). При измерении уровня фолиевой кислоты в I группе было отмечено более низкое содержание фолата, чем в контрольной группе I ($p>0,05$), тогда как во II исследуемой группе напротив – более высокое ($p>0,05$) (рис. 2).

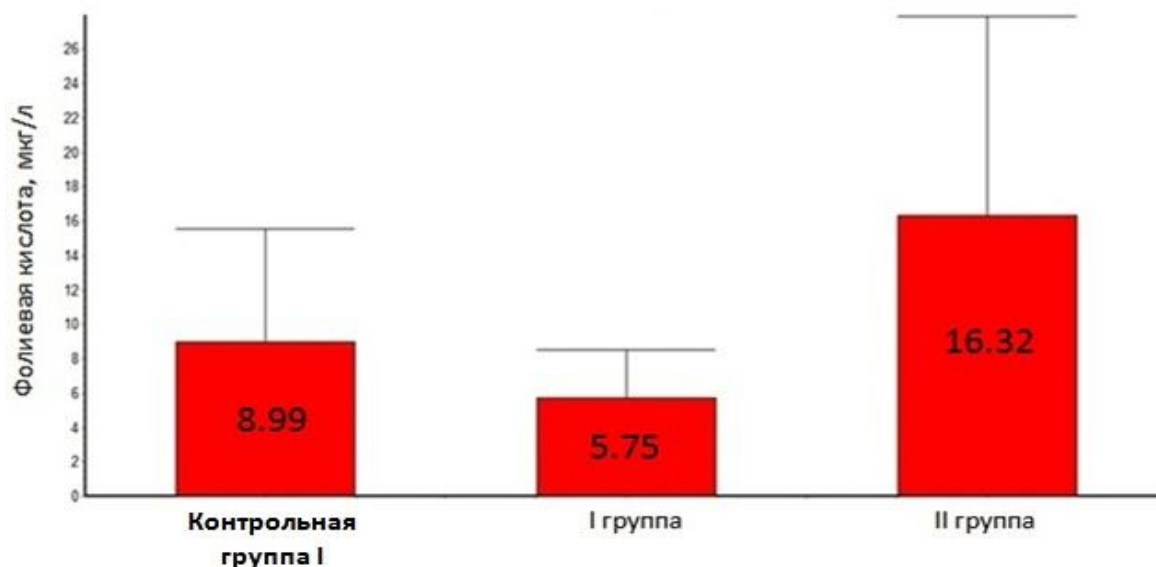


Рис. 2. Содержание фолиевой кислоты в сыворотке крови женщин с различным течением беременности.

Наблюдаемое в нашем исследовании снижение уровня фолата на 36% в сыворотке крови женщин, перенесших спонтанный аборт, может служить свидетельством негативного влияния несоответствующего норме содержания фолиевой кислоты на течение эмбриогенеза человека. В результате измерения биохимических показателей фолатного обмена при развитии истмико-цервикальной недостаточности во II триместре гестации достоверных различий в уровнях гомоцистеина и фолата обнаружено не было. Напротив, при диагностированном в III триместре гестозе (IV группа) наблюдается статистически значимые ($p \leq 0,05$) повышение уровня гомоцистеина в среднем на 23% ($10,73 \pm 0,86$ мкмоль/л) по сравнению с контролем ($8,63 \pm 0,27$ мкмоль/л) и снижение уровня фолиевой кислоты приблизительно на 44% (рис. 3).

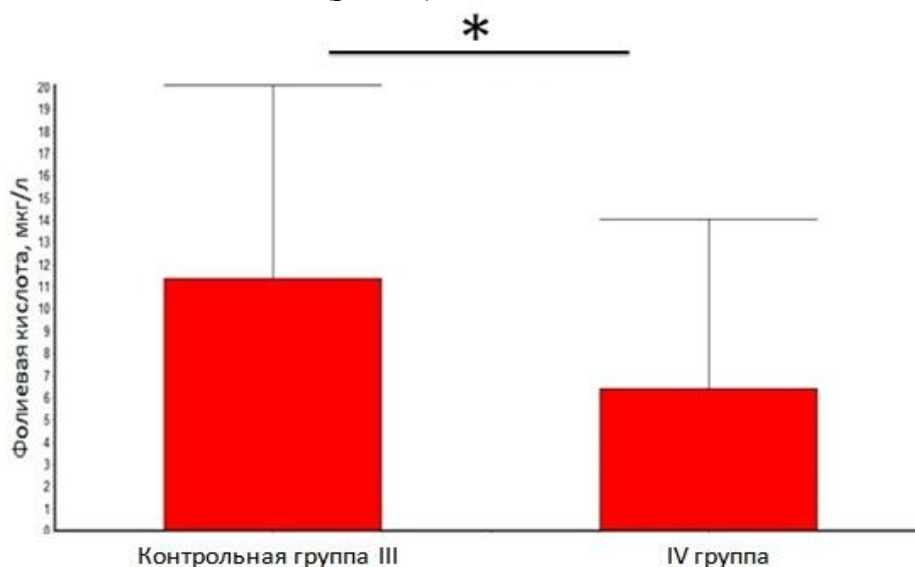


Рис. 3. Содержание фолиевой кислоты в сыворотке крови женщин в норме и при гестозе на III триместре гестации; * $p=0,05$.

В ходе статистического анализа полученных нами результатов было установлено, что повышенный уровень гомоцистеина увеличивает риск развития гестоза в 13,5 раз (ОШ=13,5; 95% ДИ: 2,12 – 86,13, при $p < 0,01$), тогда как шанс выявления гестоза при отклонении уровня фолиевой кислоты от нижней границы нормы значительно ниже (ОШ=1,75; 95% ДИ: 0,39 – 7,92, при $p > 0,05$).

При проведении молекулярно-генетических исследований фолатного обмена было показано, что у представительниц ростовской популяции для генов *MTHFR* и *MTR* превалировал нормальный аллель и доля его гомо- и гетерозигот, а для гена *MTRR* – частота аллеля G (0,57) была выше, чем для аллеля A (0,43). В I группе женщин было отмечено увеличение частоты патологического аллеля 677T гена *MTHFR* (0,33), а во II группе – мутантного аллеля 2756G гена *MTR* (0,29). Для гена *MTRR* различий в частотах аллелей 66A / 66G выявлено не было. В группах женщин с диагнозом спонтанный аборт доля гетерозигот 677C/T *MTHFR* и гомозигот 66G/G *MTRR* была выше по сравнению с контролем и группой представительниц ростовской популяции и составила 63 и 38% соответственно. Однако риск развития спонтанного аборта в присутствии мутантных аллелей 677T *MTHFR* и 66G *MTRR* был низким (ОШ=1,59 и 0,90; 95% ДИ: 0,46 – 5,48 и 0,29 – 2,78, при $p > 0,05$ соответственно). Во II группе был отмечен высокий процент гомозигот 2756G/G *MTR*, при этом риск развития неразвивающейся беременности в присутствии гомозиготного генотипа гена *MTR* был в 2 раза выше по отношению к контролю (ОШ=2,3; 95% ДИ: 0,58 – 9,16, при $p > 0,05$). Кроме того нами был проведен сочетанный анализ присутствия отклоняющихся от нормы биохимических и полиморфизмов генов ключевых ферментов фолатного метаболизма при различном течении эмбриогенеза человека, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Уровень гомоцистеина (мкмоль/л) в сыворотке крови в зависимости от генотипа генов фолатного обмена *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* и диагноза обследуемых женщин

Полиморфизм гена	Генотип	n	Контрольная группа I	n	I группа	n	II группа	p_2
<i>C677T</i> <i>MTHFR</i>	CC	16	7,38±0,56	3	7,28±0,16	4	6,34±0,89	>0,05
	CT+TT	11	9,42±1,14	5	8,00±0,94	3	8,12±1,87	>0,05
	p_1	-	>0,05	-	>0,05	-	>0,05	-
<i>A2756G</i> <i>MTR</i>	AA	20	8,32±0,75	6	7,59±0,75	5	7,66±1,18	>0,05
	AG+GG	7	7,91±0,82	2	8,16±0,86	2	5,70±1,10	>0,05
	p_1	-	>0,05	-	>0,05	-	>0,05	-
<i>A66G</i> <i>MTRR</i>	AA	7	8,14±0,73	4	8,34±0,33	6	8,15±0,63	>0,05
	AG+GG	20	8,24±0,76	4	7,12±1,09	1	6,68±1,27	>0,05
	p_1	-	>0,05	-	>0,05	-	>0,05	-

Примечание: здесь и далее результаты в таблице представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего; p_1 – уровень значимости различий гомоцистеина внутри каждой из групп женщин в зависимости от присутствия или отсутствия патологического аллеля исследуемого гена; p_2 – уровень значимости различий в концентрациях гомоцистеина между тремя исследуемыми группами женщин с одинаковыми генотипами.

Исследование содержания фолата в сыворотке крови показало, что самый высокий его уровень наблюдался во II группе женщин независимо от присутствующего у них генотипа изучаемых генов фолатного обмена (табл. 3). Концентрация фолата во II группе женщин, имевших аллель 66G гена *MTRR*, была достоверно выше более чем в 2 раза по сравнению с контролем.

Таблица 3 – Уровень фолата (мкг/л) в сыворотке крови в зависимости от генотипа генов фолатного обмена *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* и диагноза обследуемых женщин

Полиморфизм гена	Генотип	n	Контрольная группа I	n	I группа	n	II группа	p ₂
<i>C677T</i> <i>MTHFR</i>	CC	16	9,46±1,70	3	5,75±1,75	3	14,78±6,22	>0,05
	CT+TT	9	8,14±2,15	4	4,06±1,19	3	17,85±8,44	>0,05
	p ₁	-	>0,05	-	>0,05	-	>0,05	-
<i>A2756G</i> <i>MTR</i>	AA	18	10,18±1,62	5	4,44±0,88	4	17,70±5,97	>0,05
	AG+GG	7	5,90±1,82	2	5,64±3,37	2	13,55±10,55	>0,05
	p ₁	-	>0,05	-	>0,05	-	>0,05	-
<i>A66G</i> <i>MTRR</i>	AA	6	8,03±2,19	3	3,41±0,93	2	14,76±5,48	>0,05
	AG+GG	19	9,29±1,61	4	5,81±1,45	4	19,88±5,71	<0,05*
	p ₁	-	>0,05	-	>0,05	-	>0,05	-

Примечание: p₁ – уровень значимости различий фолата внутри каждой из групп женщин в зависимости от присутствия или отсутствия патологического аллеля исследуемого гена; p₂ – уровень значимости различий в концентрациях фолата между тремя исследуемыми группами женщин с одинаковыми генотипами.

Так как при неразвивающейся беременности гибель эмбриона происходит без клинических признаков выкидыша, и плодное яйцо может находиться в матке в течение длительного времени, можно заключить, что уровень фолата к моменту диагностирования данного нарушения беременности возвращается к своей физиологической норме.

Результаты исследования уровней метилирования плацентарных генов при различном течении эмбриогенеза человека

Нами были проанализированы уровни метилирования генов *DKK1*, *AREG1*, *HAND1*, *MLH1*, *ERVWE1*, *ERVFRDE1* и *BTC*, продукты экспрессии которых принимают непосредственное участие в процессах формирования и функционирования плаценты. На начальном этапе с целью исключить контаминацию образцов плацентарных тканей, мы проанализировали статус метилирования промоторной области генов-супрессоров опухолевого роста *SFRP2* и *RASSF1A*. Ранее было показано, что эти гены импринтированы в плодной части плаценты, тогда как в материнской децидуальной ткани и крови уровень их метилирования близок к нулю (Guilleret I. et al., 2009). В подтверждение наших ожиданий мы обнаружили, что промоторные регионы генов *SFRP2* и *RASSF1A* оказались неметилированными в децидуальной ткани. Уровни метилирования *RASSF1A* в хорионической ткани были несколько ниже при спонтанном аборте и неразвивающейся беременности в сравнении с уровнями метилирования этого гена при физиологически протекающей беременности, что, вероятно, указывает на присутствие незначительного количества клеток материнского проис-

хождения в образцах хорионической ткани. В связи с этим мы измерили степень контаминации образцов с помощью генотипирования четырех высоко гетерозиготных однонуклеотидных полиморфизмов. Эпигенетические исследования проводились с использованием образцов хорионической ткани, в которых индекс контаминации был ниже 10%. Для того чтобы избежать ложных выводов, нами был проведен сравнительный статистический анализ уровней метилирования только между двумя типами плацентарных тканей. Уровень метилирования CpG-сайтов, находящихся в промоторных регионах генов *AREG*, *BTC*, *DKK1*, *HAND1* и *MLH1*, был равен нулю как в децидуальной, так и в хорионической тканях. Для внутригенных районов генов *AREG* и *BTC* в обеих тканях было обнаружено тканеспецифическое метилирование. Уровни метилирования интронов 2 и 4 гена *BTC* были высокими в обоих типах плацентарной ткани. Тем не менее, уровень метилирования CpG₇ интрона 2 гена *BTC* был достоверно ниже в хорионической ткани по сравнению с его уровнем в материнской децидуальной ткани ($0,63 \pm 0,06$ и $0,82 \pm 0,03$ соответственно; $p < 0,0001$). Опираясь на существующие в литературе данные об экспрессии гена *BTC* в плацентарных тканях (Tanimura K. et al., 2004, Srinivasan R. et al., 1999), очевидно, что интрон 2 выступает в роли возможного альтернативного промотора данного гена в тканях плаценты, регулируемого тканеспецифическим метилированием. Уровень метилирования проанализированных CpG-сайтов в экзоне 2 гена *AREG* был достоверно ниже в хорионической ткани при сопоставлении с уровнями метилирования этих CpG-сайтов в децидуальной ткани ($P < 0,0001$). При этом нами было установлено, что экспрессия гена *AREG* наблюдается только в хорионической ткани. Таким образом, можно заключить, что экзон 2 гена *AREG* играет роль альтернативного промотора этого гена в плацентарных тканях, тканеспецифическое метилирование которого регулирует экспрессию гена *AREG* в плаценте. При исследовании CpG-сайтов, локализованных на 5'-конце (5'LTR) генов *ERVWE1* и *ERVFRDE1*, было обнаружено, что они также метилированы в различной степени. Уровни метилирования проанализированных CpG-сайтов, расположенных в 5'LTR регионе генов *ERVWE1* и *ERVFRDE1*, были достоверно ниже в хорионической ткани при сопоставлении с уровнями метилирования этих CpG-сайтов в децидуальной ткани ($P < 0,0001$). Наблюдаемое в нашем исследовании гиперметилирование 5'LTR гена *ERVWE1* в децидуальной ткани необходимо для подавления функциональной активности данного гена в материнской части плаценты. Согласно результатам нашего исследования 5'LTR регион гена *ERVFRDE1* гипометилирован в хорионической ткани и имеет высокий уровень метилирования в материнской части плаценты. Для обоих исследованных CpG-сайтов ретроэлементов *LINE1* и *HERVK* уровни метилирования были достоверно ниже в хорионической ткани по сравнению с децидуальной тканью матери ($P < 0,0001$). Уровень метилирования всех проанализированных CpG-сайтов, локализованных в промоторных регионах генов *AREG*, *BTC*, *DKK1*, *HAND1* и *MLH1*, в крови был также как и в плацентарных тканях равен нулю. Подобно децидуальной ткани, экзон 2 гена *AREG*, интроны 2 и 4 гена *BTC* и 5'LTR гена *ERVWE1* были гиперметилированы в крови. Уровень метилирования ретротранспозонов *LINE1* и *HERVK* был немного выше в крови по

сравнению с децидуальной тканью. Результаты глубокого бисульфитного секвенирования согласуются с результатами, полученными путем SIRPH-метода (рис. 4). На рисунке отчетливо видно, что регионы экзон 2 гена *AREG*, 5'LTR *ERVWE1* и *ERVFRDE1*, LTR *HERVK* и 5'UTR *LINE1* существенно гипометилированы (синие полосы) в хорионической ткани (ХТ).

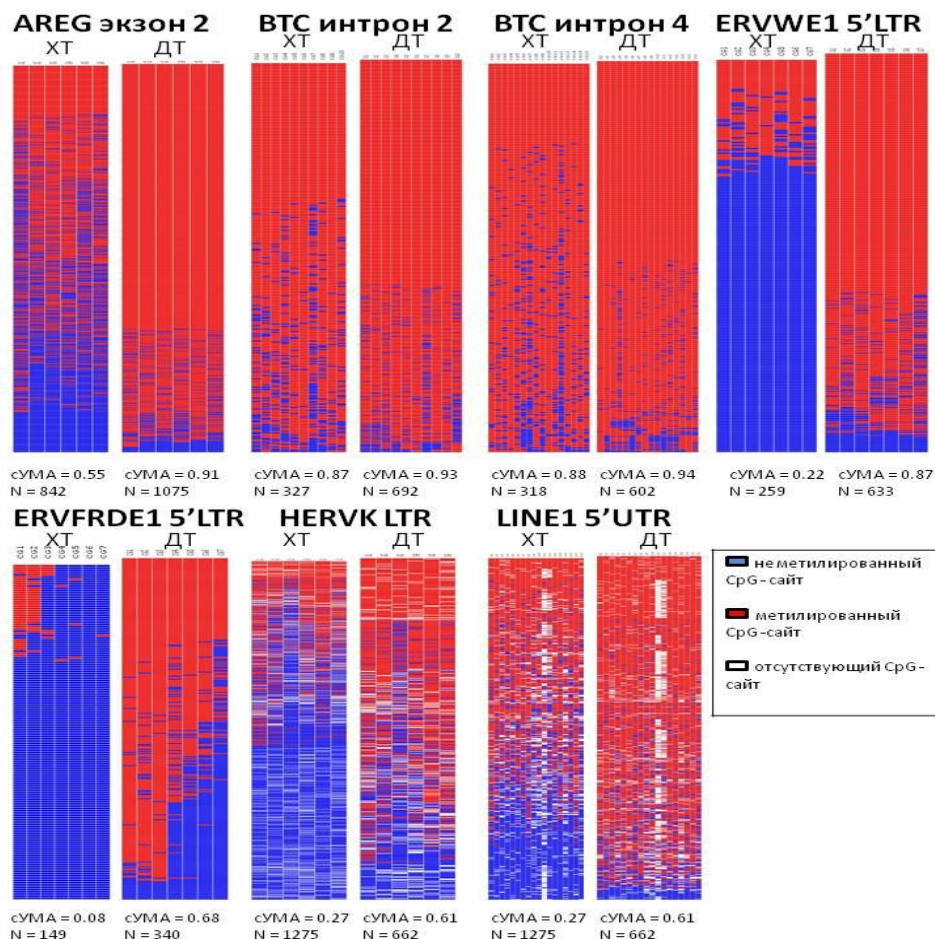


Рис. 4. Паттерны метилирования *AREG*, *BTC*, *ERVWE1*, *ERVFRDE1*, *HERVK* и *LINE1* в плаценте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день поиск причин и диагностических маркеров нарушения эмбриогенеза человека является приоритетной задачей эмбриологии человека, так как доля репродуктивных потерь неуклонно растет. Среди многочисленных факторов риска патологического течения эмбрионального развития человека aberrantным показателем фолатного обмена уделяется особое внимание. Важной особенностью фолатного метаболизма является его связь с процессами метилирования ДНК на ранних этапах онтогенеза человека. По результатам нашего исследования биохимических показателей фолатного обмена были установлены диапазоны и динамика изменения их содержания в ходе физиологической беременности. Максимальное снижение гомоцистеина наблюдается во II триместре беременности. Уровень фолата в сыворотке крови беременных женщин ниже, чем у небеременных, причем максимальное его снижение наблюдается в I триместре беременности. Таким образом, установленные диапазоны содержания и выявленная динамика уровней гомоцистеина и фолиевой кислоты в тече-

ние физиологически протекающей беременности позволят своевременно диагностировать отклонения биохимических показателей фолатного метаболизма и формировать группу риска развития осложнений эмбриогенеза человека, ассоциированных с измененным фолатным обменом. Кроме того, было установлено, что биохимические показатели фолатного метаболизма, в частности гомоцистеин, являются достоверными факторами риска и диагностическими маркерами развития гестоза на более поздних этапах эмбриогенеза человека. Для своевременного выявления риска возникновения неразвивающейся беременности целесообразно измерять биохимические показатели на первых неделях эмбрионального развития. В результате исследования молекулярно-генетических детерминант фолатного обмена были установлены частоты встречаемости мутантных аллелей и патологических генотипов генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* у представительниц ростовской популяции, вследствие чего повысилось качество прогностических мероприятий по оценке риска развития неблагоприятного исхода беременности. При проведении диагностики нарушений эмбриогенеза, ассоциированных с полиморфизмами генов фолатного обмена рекомендовано уделять наиболее пристальное внимание носительству женщинами полиморфизма С677Т гена *MTHFR*, отягощающего течение беременности. Помимо аномальных уровней биохимических показателей и полиморфизмов генов фолатного метаболизма был изучен паттерн метилирования промоторных регионов генов, играющих главную роль в развитии и функционировании плаценты. Нами было установлено, что общий уровень метилирования в хорионической ткани ниже по сравнению с другими соматическими тканями. Кроме этого, полученные нами данные относительно тканеспецифического метилирования промоторных регионов генов *ERVFRDE1* и *ERVWE1* и внутригенных областей генов *AREG* и *BTC* могут быть использованы для дальнейших исследований в области наследования эпигенетического паттерна, влияния окружающей среды на эмбриональное развитие человека, а также для выяснения эпигенетических причин различных нарушений эмбриогенеза человека.

ВЫВОДЫ

1. Диапазоны содержания гомоцистеина и фолиевой кислоты в сыворотке крови небеременных женщин Ростовской области равны: 5,442 – 11,354 мкмоль/л и 2,04 – 26,96 мкг/л для гомоцистеина и фолиевой кислоты соответственно, у беременных женщин: 2,081 – 14,35, 1,33 – 10,66, 4,53 – 12,72 мкмоль/л и 2,42 – 15,56, 9,33 – 17,33, 2,67 – 20,09 мкг/л в I, II и III триместрах физиологически протекающей беременности соответственно.

2. Среди широкого спектра нарушений эмбриогенеза человека повышенный уровень гомоцистеина является достоверным фактором риска и диагностическим маркером гестоза, так как было установлено, что в III триместре беременности повышенный уровень гомоцистеина в сыворотке крови женщин ростовской популяции увеличивает риск развития гестоза в 13,5 раз.

3. Низкий уровень содержания фолиевой кислоты в сыворотке крови беременных женщин также является достоверным фактором риска развития гестоза. Причем для своевременной диагностики таких нарушений эмбриогенеза чело-

века, как неразвивающаяся беременность, измерение содержания фолата необходимо проводить на первых неделях гестации.

4. Частоты распространения аллелей 677Т *MTHFR*, 2756G *MTR* и 66G *MTRR* при физиологической беременности достоверно не отличаются от частот этих аллелей в ростовской популяции и равны 0,22, 0,15 и 0,46 соответственно.

5. При спонтанном аборте отмечена тенденция к повышению доли гетерозигот 677С/Т *MTHFR* (63%) и гомозигот 66G/G *MTRR* (38%), при неразвивающейся беременности – гомозигот 2756G/G *MTR* (29%). Спонтанный аборт ассоциирован с наличием патологических аллелей 677Т и 66G генов *MTHFR* и *MTRR* соответственно. Риск развития неразвивающейся беременности в 2 раза выше при носительстве полиморфизма А2756G гена *MTR* в гомозиготном состоянии.

6. Уровень метилирования промоторных регионов генов *DKK1*, *HAND1*, *MLH1* и *AREG* в плацентарных и соматических тканях равен нулю. Для регионов экзон 2 гена *AREG*, экзон 1 / интрон 1, интроны 2 и 4 гена *BTC*, 5'LTR генов *ERVWE1* и *ERVFRDE1*, LTR *HERVK* и 5'UTR *LINE1* показано тканеспецифическое метилирование в децидуальной и хорионической тканях. Отмечено глобальное гипометилирование геномной ДНК в хорионической ткани плаценты.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные в результате проведенного исследования диапазоны содержания гомоцистеина и фолиевой кислоты рекомендуется использовать при формировании региональных референтных интервалов биохимических показателей фолатного обмена для жительниц Ростовской области.

2. Для своевременного выявления риска развития гестоза целесообразно измерять биохимические показатели фолатного метаболизма, в частности гомоцистеин, на первых неделях эмбрионального развития.

3. Установленные в ходе молекулярно-генетического исследования частоты встречаемости мутантных аллелей и патологических генотипов генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* у представительниц ростовской популяции следует использовать для оценки риска развития неблагоприятного исхода беременности.

4. Паттерн метилирования промоторных регионов генов *ERVFRDE1* и *ERVWE1* и внутригенных областей генов *AREG* и *BTC* рекомендуется применять для идентификации эпигенетических причин различных нарушений эмбриогенеза человека.

5. Результаты биохимических, молекулярно-генетических и эпигенетических исследований настоящей работы могут быть использованы в качестве научного и практического материала при составлении учебных пособий, чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий студентов по дисциплинам: эмбриология человека, медицинская генетика, эпигенетика.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Деревянчук, Е.Г. Гомоцистеин как новый маркер в оценке состояния плода / Е.Г. Деревянчук // От экспериментальной биологии к превентивной и инте-

гративной медицине: Материалы международного междисциплинарного симпозиума. – Судак, 2008. – С. 48-49.

2. Деревянчук, Е.Г. Разработка новой тест-системы для оценки состояния плода / Е.Г. Деревянчук // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы II Международной научной конференции. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2008. – С. 149-151.

3. Деревянчук, Е.Г. Изучение динамики гомоцистеина на разных неделях гестации при нормально протекающей беременности / Е. Г. Деревянчук // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы III Международной научно-практической конференции – Ростов-на-Дону: Изд-во СКНЦ ВШ ЮФУ, 2009. – С. 140-141.

4. Деревянчук, Е.Г. Метаболизм гомоцистеина и фолиевой кислоты при осложненной и физиологически протекающей беременности / Е.Г. Деревянчук, О.В. Келлер // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: I Международная научно-практическая конференция / Сборник трудов. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 100-101.

5. Деревянчук, Е.Г. Динамика фолиевой кислоты и гомоцистеина в течение беременности / Е.Г. Деревянчук, И.О. Покудина, А.А. Родионов, Т.П. Шкурят // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: Материалы I международной научно-практической конференции. – М., 2010. – С. 126.

6. Деревянчук, Е.Г. Полиморфизм генов фолатного цикла у женщин с невынашиванием беременности / Е.Г. Деревянчук, К.А. Коваленко, Е. В. Машкина, А.Н. Рымашевский, Т.П. Шкурят // Молекулярная диагностика-2010: VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием / Сборник трудов. – М., 2010. – С. 101-102.

7. Белик, Т.В. Исследование частот полиморфных аллелей генов фолатного цикла у матерей с эмбриональной потерей плода / Т.В. Белик, Е.Г. Деревянчук // Валеология. – 2010. – № 4. – С. 31-33.

8. Шкурят Т.П. Исследование прогностических молекулярно-генетических маркеров эмбриогенеза человека / Т.П. Шкурят, Л.В. Гутникова, Е.Г. Деревянчук, Е.В. Машкина // Главный врач. – 2010. – № 4. – С. 6-8.

9. Деревянчук, Е.Г. Исследование уровня метилирования плацентарных генов при физиологически протекающей беременности / Е.Г. Деревянчук, N. Souren, K. Leriukhov // Студент и научно-технический прогресс: Материалы XLVIII Международной научной студенческой конференции. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. гос. ун-т, 2011. – С. 218.

10. Деревянчук, Е.Г. Оценка уровня метилирования генов DKK1, HAND1 и MLN1 в плацентарных тканях при неблагоприятном исходе беременности / Е.Г. Деревянчук, N. Souren, K. Leriukhov // Модернизация науки и образования: Всероссийская научная конференция / Сборник статей. – Махачкала: Издательство ИП «Овчинников», 2011. – С. 37.

11. Деревянчук, Е.Г. Изучение роли уровня метилирования генов AREG и BTC в патогенезе эмбрионального развития человека / Е.Г. Деревянчук, N. Souren, K. Leriukhov // Медико-биологические аспекты мультифакториальной пато-

логии: II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием / Сборник материалов. – Курск: КГМУ, 2011. – С. 50-52.

12. Деревянчук, Е.Г. Сравнительный анализ уровней метилирования генов ERVWE1 и ERVFRDE1 в плацентарных тканях на ранних сроках беременности / Е.Г. Деревянчук, N. Souren, K. Lеріkhov, Т.П. Шкурат // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия Медицина. – 2011. – № 5. – С. 27-33.

13. Деревянчук, Е.Г. Статус метилирования LINE1 элементов в плацентарных и соматических тканях при физиологически протекающей беременности / Е.Г. Деревянчук // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы IV Международной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону: Изд-во СКНЦ ВШ ЮФУ, 2011. – С. 51-52.

14. Деревянчук, Е.Г. Биохимические и генетические критерии фолатного метаболизма и нарушения эмбриогенеза человека [Электронный ресурс] / Е.Г. Деревянчук, Е.В. Машкина, К.А. Коваленко, А.А. Александрова, А.В. Шестопапов, А.Н. Рымашевский, О.В. Келлер, Т.П. Шкурат // Современные проблемы науки и образования: Электронный журнал. – 2011. – № 4; URL: www.science-education.ru/98-4738 (дата обращения: 10.10.2011).

15. Деревянчук, Е.Г. Оценка содержания гомоцистеина и фолиевой кислоты в сыворотке крови матерей с истмико-цервикальной недостаточностью // Е.Г. Деревянчук, И.О. Покудина, А.А. Родионов, А.А. Александрова, А.Н. Рымашевский // Мать и дитя: XII Всероссийский научный форум / Сборник материалов. – М., 2011. – С. 48-49.

16. Золотухин П.В. Интенсивность свободнорадикальных процессов и содержание гомоцистеина у женщин с гестозом и их новорожденных / П.В. Золотухин, Е.Г. Деревянчук, А.А. Александрова, А.С. Гончарова, А.В. Шестопапов, А.Н. Рымашевский, Т.П. Шкурат // Мать и дитя: XII Всероссийский научный форум / Сборник материалов. – М., 2011. – С. 70-71.

17. Деревянчук, Е.Г. Роль гомоцистеина и фолиевой кислоты в развитии гестоза на поздних этапах эмбриогенеза человека / Е.Г. Деревянчук, А.А. Александрова, А.Н. Рымашевский // Валеология. – 2011. – № 3. – С. 63-66.

Перечень использованных сокращений

СА – спонтанный аборт

НБ – неразвивающаяся беременность

ФБ – физиологически протекающая беременность

ИЦН – истмико-цервикальная недостаточность

Г – гестоз

SNuPE (single-nucleotide primer extension) – метод однонуклеотидной элонгации праймера

MTHFR – ген 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы

MTRR – ген метионинсинтазы редуктазы

MTR – ген метионинсинтазы

SFRP2 – ген-супрессор опухолевого роста

RASSF1A – ген-супрессор опухолевого роста

DKK1 – ген белка *Dickkopf homolog 1 (DKK1)*, представителя семейства потенциальных онкосупрессоров *Dickkopf*

AREG1 – ген амфирегулина

HAND1 (heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1) – белок, экспрессирующийся в сердце и некоторых производных нервного гребня

MLH1 (mutator L homolog 1) – ген белка, участвующего в репарации ДНК

ERVWE1 – ген белка синцитин-1

ERVFRDE1 – ген белка синцитин-2

LINE1 (long interspersed nuclear element 1, L1) – мобильные элементы млекопитающих

LTR (long terminal repeat) – длинный концевой повтор

UTR (untranslated region) – нетранслируемый регион

BTC – ген бетацеллюлина

HERVK – ген эндогенного ретровируса человека типа *K*